

**Die Basenzusammensetzung der DNS
der Grünalge Chlorella**

Ein Beitrag zur Taxonomie der Gattung Chlorella

von

VOLKER HELLMANN

aus Wanne-Eickel

'973

Die Basenzusammensetzung der DNS der Grünalge Chlorella.

Ein Beitrag zur Taxonomie der Gattung Chlorella.

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Volker Hellmann
aus
Wanne-Eickel

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg.



Tag der mündlichen Prüfung: 28. 11. 1973

Dekan: Prof. Dr. J. Christiansen

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. E. Kessler

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. W. Haupt

Inhaltsübersicht

	Seite
A) Einleitung	3
B) Material und Methoden	4
C) Ergebnisse	6
I. Darstellung der DNS	6
II. Bestimmung der Basenzusammensetzung der DNS	16
III. Taxonomie und Basenzusammensetzung der DNS von <u>Chlorella</u>	25
D) Diskussion	33
E) Zusammenfassung	36
F) Literatur	37

Abkürzungen

A	= Adenin
Chl.	= Chlorella
CTA	= Cetyltrimethylammoniumbromid
DNase	= Desoxyribonuclease
dpG,dpA, dpC,dpT	= 5'-Desoxyribonucleosidmonophosphate
G	= Guanin
MAK	= methyliertes Serumalbumin Kieselguhr
N.S.	= Nukleinsäuren
RNase	= Ribonuclease
SSC	= Sodium Saline Citrate
TRIS	= Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

A) Einleitung

Auf Grund physiologisch-biochemischer Merkmale erscheint es sinnvoll, die Gattung Chlorella in 11 Taxa zusammenzufassen (Kessler, 1967; Kessler et al., 1968; Kessler u. Zweier, 1971; Kessler, 1972b). Diese Taxa wurden von Fott u. Nováková (1969) morphologisch-zytologisch bearbeitet. Eine taxometrische Behandlung der Gattung Chlorella (außer Chl. fusca var. rubescens Dangeard) führte zu 10 Taxa (Da Silva u. Gyllenberg, 1972), unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Fott/Nováková, Kessler et al. und Shihira/Krauss. Neben dieser phänetischen Beschreibung der Gattung Chlorella ist bei Pinjewitsch u. Nikiforowa (1964) für drei Stämme und drei Arten der Versuch einer Beschreibung auf molekularer Ebene auf Grund der Basenzusammensetzung der Gesamt-RNS bzw. -DNS gemacht worden. Chlorella bildet aber in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium mehrere RNS-Spezies (Aoki u. Hase, 1967; Galling u. Hemleben-Vielhaben, 1967; Richter u. Beiderbeck, 1969). Nachgewiesen wurde auch Satelliten-DNS, die eine von der Kern-DNS abweichende Dichte aufweist (Iwamura u. Kuwashima, 1969; Chun et al., 1963; Oshio u. Hase, 1968; Bayen u. Rode, 1970). Es erscheint daher angebracht eine mehr detaillierte Analyse vorzunehmen. Wir haben versucht einen ersten Schritt zu tun, indem wir bei einer umfassenden Anzahl von Chlorella-Stämmen ein einfaches molekulares Merkmal, die Basenzusammensetzung der Kern-DNS, bestimmten.

B) Material und Methoden

Versuchsobjekte und Kulturbedingungen

Untersucht wurden 88 Stämme von Chlorella, die bei Kessler (1967), Kessler et al. (1968) und Kessler u. Zweier (1971) angegeben sind. Die Kultur der Algen erfolgte unter sterilen Bedingungen, in Rundkolben von 6 Liter Inhalt, bei 25°C und 4 000 Lux Dauerlicht, bei Begasung mit Preßluft, der 3,5 Vol% CO₂ beigemischt wurde. Die Zusammensetzung der Nährlösung findet sich bei Kessler u. Czygan (1970) und Kessler u. Zweier (1971). Chlorella homosphaera und Chlorella vulgaris f. tertia 211-18 wuchsen in der normalen Nährlösung nach Kessler u. Czygan (1970) unter Zusatz von 0,2% Hefeextrakt (Merck). Die Kulturdauer der Algen betrug etwa zwei Wochen.

Aufschluß der Algenzellen

Die Organismen wurden im Durchflußverfahren sedimentiert, das Pellet zweimal mit eiskaltem aqua dest. oder verdünntem Phosphatpuffer gewaschen. 10 ml naß gepacktes Pellet konnten in einem Arbeitsgang mit Quarzsand bei 0°C im Mörser schnell aufgeschlossen werden.

Extraktion der Nukleinsäuren

Die Extraktion der N.S. erfolgte in Anlehnung an Marmur (1961). Behandlung mit puffergesättigtem Phenol (pH 8,0) und Ausäthern des Phenols (Colter, 1962) führte zu weitgehend proteinfreien Produkten.

Reinigung der DNS

Zur RNS-Hydrolyse diente Pankreas RNase und RNase T₁ (Serva). Aus deproteinisierten, RNS-freien Lösungen wurde die DNS mit CTA gefällt (Ralph u. Bellamy, 1964). Eine weitere Reinigung der DNS erfolgte durch Dichtegradienten-Zentrifugation in CsCl (Merck) (Spinco 50Ti, 44 000 Upm, 48 h, n_D = 1,4000 bei 20°C). Zur Methodik der präparativen Ultrazentrifugation verweisen wir auf Flamm et al. (1969).

Thermische Denaturierung der DNS

Die TM-Werte wurden nach Marmur u. Doty (1962) in 0,1 SSC im

modifizierten PMQ II (Zeiss) gemessen. In einer Küvette befand sich eine Temperatursonde (Telethermometer 42SC/402, Yellow Springs Instr., Ohio).

Säurehydrolyse der DNS

Die Hydrolyse erfolgte in 0,1 N HCl bei 100°C. Die Hydrolysezeit betrug 45 min (Broughton et al., 1972; Kirk, 1967b). Die freigesetzten Basen Guanin und Adenin ließen sich auf sulfoniertem Polystyrolharz DOWEX 50W X8, 200-400 mesh (Serva) im HCL-Gradienten auftrennen und im Eluat quantitativ bestimmen.

Analytische Ultrazentrifugation

Die Schwebelichten der DNS wurden in CsCl bestimmt (Mandel et al., 1968).

MAK-Chromatographie

Für die Chromatographie der N.S. auf MAK wurde die Vorschrift nach Mandell u. Hershey (1960) in vereinfachter Weise verwendet. Das Methylieren des Albumins (Fraktion Nr.V nach Cohn, Serva) erübrigt sich durch Verwendung eines käuflichen Produkts mit gleichen Eigenschaften (Serva).

Gelelektrophorese

Die Bedingungen zur Gelbereitung und Elektrophorese finden sich bei Peacock u. Dingman (1968).

C) Ergebnisse

I. Darstellung der Kern-DNS

1. Einfluß der Kulturbedingungen auf die Zusammensetzung der Chlorella-Nukleinsäuren

Von russischen Autoren wird behauptet, daß das Zellalter von Grünalgen einen Einfluß auf die Basenzusammensetzung der DNS hat (siehe bei Pinjewitsch u. Nikiforowa, 1964). Diese Ergebnisse finden vielleicht ihre Erklärung darin, daß bei asynchron wachsenden Algen die Synthesen von Kern- und Chloroplasten-DNS zeitlich nicht aufgelöst werden können. Da die Chloroplasten-DNS in meßbaren Mengen in der Zelle vorhanden ist und eine von der Kern-DNS deutlich unterscheidbare Zusammensetzung aufweist, kann das möglicherweise bei einer DNS-Gesamtanalyse zu kleinen Unterschieden der DNS-Zusammensetzung in Abhängigkeit vom Zellalter führen. Eine Synchronisation von 88 Algenstämmen, die in dieser Richtung nicht umfassend untersucht worden sind, ist nur mit großem Zeitaufwand möglich. Die von uns untersuchten Zellen entstammten daher asynchronen Kulturen, die ihr Wachstum eingestellt hatten. Unter unseren Bedingungen war das nach ca. 14 d Kulturdauer der Fall. Die Zellen zeigten mikroskopisch ein relativ einheitliches Bild. Die Kulturdauer hat keinen großen Einfluß auf die DNS-Menge, wie Abb.1 zeigt. Es handelt sich um Präparationen von zwei Wochen bzw. sechs Wochen alten Algen. Die Extinktion der Elutionsprofile bezieht sich auf die gleiche Menge sog. naßgepackter Algenzellen. Deutliche Unterschiede zeigt dagegen die RNS-Menge (vgl. Galling u. Hemleben-Vielhaben, 1967). Kein Unterschied zeigt sich im "Schmelzprofil" der DNS von sechs Tage alten Zellkulturen und Zellen, die ihr Wachstum nach 14 d Kulturdauer eingestellt hatten (Chl. fusca 211-8b).

2. Kontamination mit Fremdorganismen

In älteren Zellkulturen von autotrophen Algen besteht die Gefahr von Bakterienwachstum durch Abscheidung und Anreicherung organischer Substanzen in das Nährmedium. Um jegliche Kontamination auszuschließen, wurden die geernteten Algenzellen in aqua

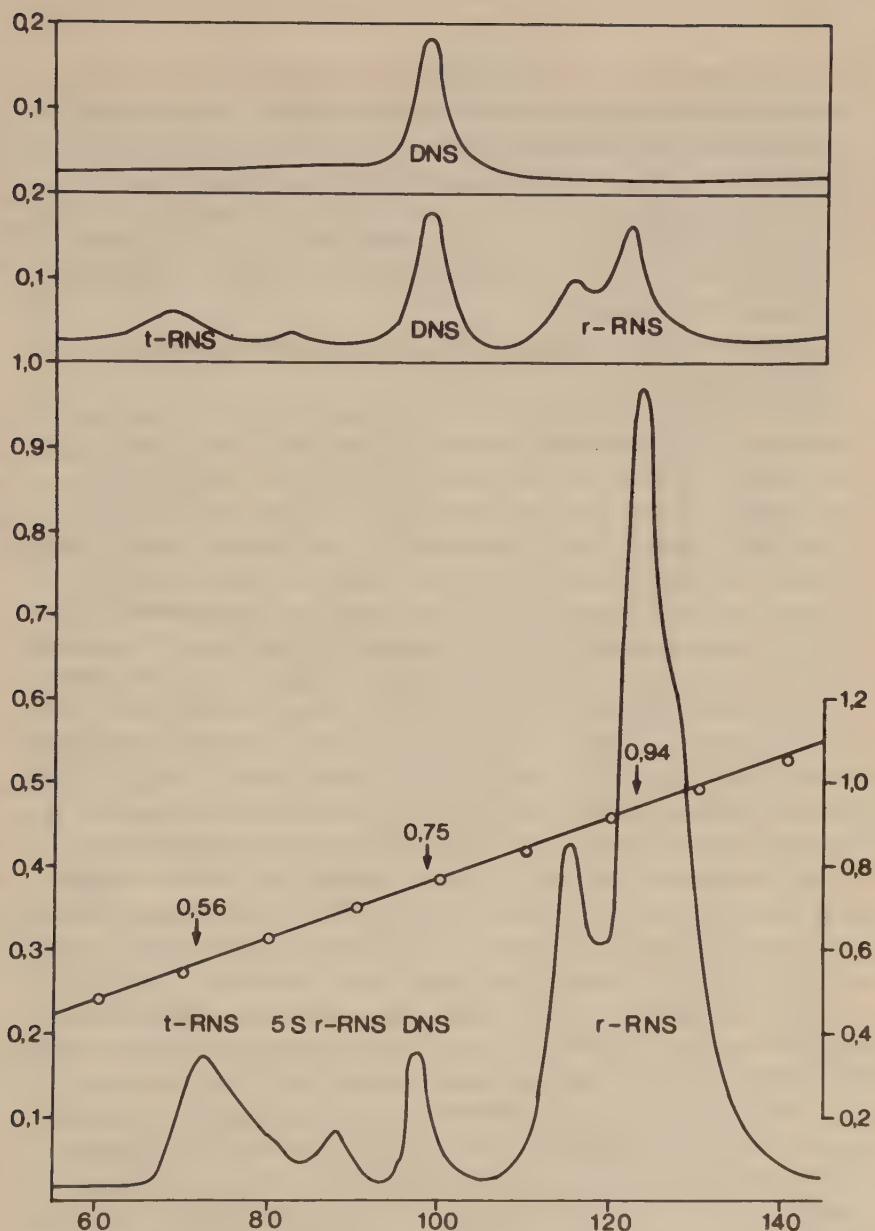


Abb.1 Mak-Chromatographie der N.S. von *Chl. fusca* 211-8b. Ordinate links: E bei 258nm; Ordinate rechts: NaCl-Gradient, Mol NaCl. Abszisse: Fraktionen;
 Abb. oben: Normalalgen nach RNase-Behandlung
 Abb. Mitte: Stickstoffmangelalgen, 6 Wochen alt
 Abb. unten: Normalalgen, 2 Wochen alt

dest. resuspendiert und niedertourig zentrifugiert. Eventuell vorhandene Bakterien werden osmotisch zerstört oder bleiben im Überstand. Kontamination durch Pilze wurde nicht beobachtet. Chl. vulgaris, Chl. vulgaris f. tertia, Chl. minutissima und Chl. protothecoides zeigen bei Suspension in aqua dest. starke Schleimabsonderung und ein Pellet wird nicht gebildet. Durch Verwendung von 0,01 M Phosphatpuffer pH 6,5 läßt sich diese Schwierigkeit umgehen.

3. Ergebnisse verschiedener Methoden zur Homogenisierung der Algenzellen

Obwohl es bisher nicht möglich ist, Chlorella-Zellen zur Gewinnung von Makromolekülen ohne mechanische Einwirkung aufzuschließen, zeigen u.a. Arbeiten von Bayen u. Rode (1970) und Wanka et al. (1970), daß die DNS jene Kriterien aufweist, um aus Schmelzprofil und Schwebedichte die Basenzusammensetzung zu bestimmen. Ausgehend von maximal gepackten Algenpellets testeten wir drei Methoden zur Zerstörung der Zellwände: Aufschluß mit Glasperlen im Bühler-Zellhomogenisator: Es zeigte sich, wie zu erwarten war, daß bei Chl. fusca 211-8b die DNS und RNS zunehmend degradiert wird, je länger homogenisiert wird (vgl. Richter u. Senger, 1964). Eine Verkürzung der Aufschlußzeiten läßt sich durch Verwendung größerer Perlen erreichen, die mehr als 0,3 mm im Durchmesser haben. Entscheidend für die Länge der Aufschlußzeit ist auch die Viskosität der Paste aus Algen, Puffer und Glasperlen. Der Übergang von fester zu flüssiger Konsistenz ist optimal, d.h. erfordert die kürzeste Zeit zur Zerstörung der Zellwände. 10 ml Paste, die etwa 2 ml Algenpellet enthalten, lassen sich innerhalb 1 min zerstören und ergeben eine an MAK adsorbierbare DNS. Der Bühler-Zellhomogenisator versagt bei größeren Mengen von Algenzellen (Verlängerung der Aufschlußzeit), und vor allem lassen sich die in ihrer Zellgröße sehr kleinen Algenarten wie Chl. vulgaris f. tertia, auch schon Chl. luteoviridis, nach 10 - minütiger Behandlung nicht homogenisieren. Die Zellwände sind lichtmikroskopisch betrachtet voll intakt, während der Zellinhalt homogen erscheint. Lyse mit Hilfe von Enzymen: Eine ideale Methode zur Darstellung hochmolekularer DNS geht bei Bakterien und Blaualgen von der

Tabelle 1

Maximale Zunahme der Extinction in %, im Bezug auf die E bei 25°C,
260 nm

Durchschnittswert aus den Stämmen der Art	Hyper= chromizität	TM-Wert berech= net für 1xSSC
Chl. minutissima	40%	86,9
Chl. luteoviridis	42%	87,3
Chl. zofingiensis	40%	89,2
Chl. fusca	40%	89,9
Chl. saccharophila	39%	90,0
Chl. vulgaris f. tertia 211-18	38%	91,9
Chl. kessleri	38%	92,3
Chl. vulgaris 211-11r, 211-30	39%	92,8
Chl. saccharophila 211-1a, C-1.3.1	37%	92,9
Chl. fusca var. rubescens	38%	93,0
Chl. protothecoides	37%	94,6
Chl. vulgaris	37%	94,8
Chl. zofingiensis C-1.2.1	36%	95,7
Chl. vulgaris f. tertia 211-31, 1-9-30	35%	97,4
Chl. homosphaera	33%	97,8
Chl. vulgaris f. tertia 211-40a, 211-40c, Prag A14	32%	101,4

Lyse des Sacculus mit Lysozym aus. Bei Chlorella wird von vielen Seiten eine Lyse der Zellwand durch Zellulasen und Pektinasen, etwa zur Darstellung von Protoplasten und Chloroplasten, gefordert. Wir verwendeten ein Gemisch von Zellulasen (Mazerozym, All Japan Biochemicals) und Pektinase (Serva). Die Ansätze wurden bei 40°C im Acetatpuffer bei pH 5,0 inkubiert. Die Kontrolle aus Scheiben von Kartoffelknollen zeigte deutliche Lyse der Zellwände. Bei Chlorella war lichtmikroskopisch keinerlei Veränderung der Zellwand festzustellen. Auch eine anschließende Homogenisierung des Inkubats in der Bühler-Zellmühle erforderte die gleiche Aufschlußzeit wie bei unbehandelten Zellen. Getestet wurden Chl. fusca 211-8b und Chl. vulgaris 211-11r.

Aufschluß mit Quarzsand: Zerreiben mit Gemischen aus Quarz und Quarzsand im Mörser ergab eine DNS, die den Erfordernissen entsprach einerseits einen TM-Wert und die Schwebedichte nativer DNS zu bestimmen und andererseits genügend hohe Ausbeuten zur Durchführung der sauren Hydrolyse zu erhalten. Die Hyperchromizität der thermischen Denaturierung dient als Kriterium für die Qualität der DNS. Sie liegt zwischen 30% und 40% (siehe Tab.1). Die Abnahme der Hyperchromizität bei hochschmelzender DNS deuten wir nach Mandel u. Marmur (1968;S.204). Das Mischungsverhältnis von Quarz und Quarzsand ist nicht wesentlich. Eine der beiden Komponenten allein verwendet führt ebenso zur Homogenisierung. Zugabe von Sand beschleunigt die Vermischung von Algen und Partikeln beim Mörsern. Der Vorteil der Methode gegenüber der Verwendung des Zellhomogenisators liegt darin, daß der eigentliche Aufschluß erst beginnt, wenn die Sand- und Quarzteilchen eine bestimmte Kleinheit erreicht haben, und dann sehr rasch alle Zellen erfaßt werden (Kontrolle im Lichtmikroskop). Die Konsistenz der Paste ist entscheidend für die Aufschlußzeit: in ein hochtourig zentrifugiertes Pellet muß etwa die 4-5 fache Menge an Quarz und Sand verrührt werden. Der Aufschluß erfolgt bei 0°C; trotzdem kommt es zu einer Degradierung der r-RNS durch wahrscheinlich hochaktive RNasen, wie die Chromatographie auf MAK zeigt (Abb.2). Zugabe von einigen Tropfen Phenol/Puffer zum Aufschluß hemmt die Enzymaktivitäten (Abb.1 unten). 10 - 20 ml

Pellet lassen sich in einem Arbeitsgang aufschließen. Die Aufschlußzeiten betragen für Chl. fusca, Chl. saccharophila, Chl. luteoviridis und Chl. kessleri 2 - 3 min. Chl. vulgaris f. tertia und Chl. vulgaris, vor allen die Stämme 211-40a und 211-40c, müssen die doppelte Zeit homogenisiert werden. Die Größe der Zellen allein kann nicht entscheidend sein, da Chl. minutissima relativ rasch zerstört wird.

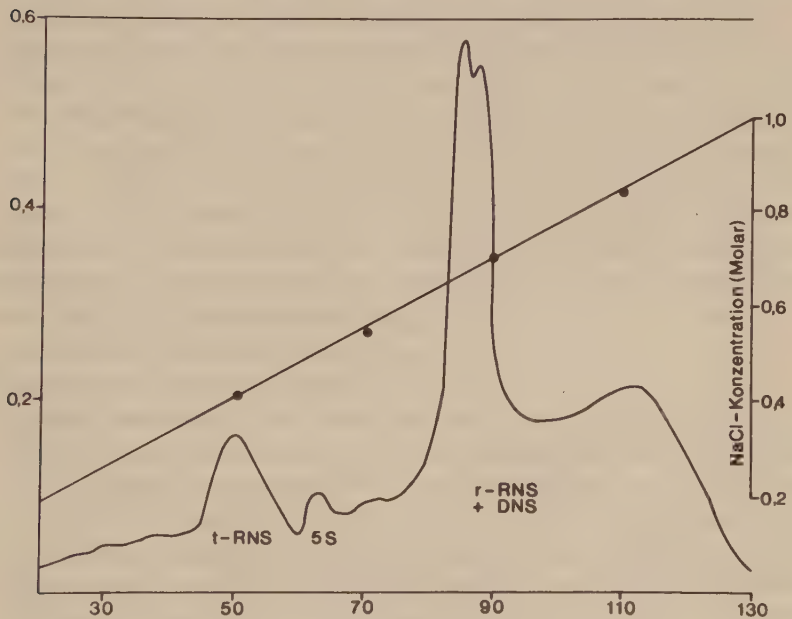


Abb.2 MAK-Chromatographie der N.S. von Chl. fusca 211-8b nach Aufschluß ohne Phenolzusatz. Ordinate: E bei 258 nm, Abszisse: Fraktionen

Die Gewinnung von Bakterien-DNS erfolgt aus praktischen Gründen in vielen Fällen aus lyophilisierten Zellen. Nach Bayen u. Rode (1970) und Grisvard u. Guille (1973) läßt sich native DNS auch aus lyophilisierten Chlorellen und Pflanzengeweben gewinnen. Einfrieren bei -60°C genügt nicht, flüssiger Stickstoff ist erforderlich. Ein weiterer Vorteil der Methode ist das Fehlen von RNase- und DNase-Aktivität beim Aufschluß des getrockneten Materials. Das Produkt zeigt bei Chl. fusca 211-8b einen aus dem TM-Wert berechneten GC-Gehalt von 50,3%. Die Hyperchromizität beträgt allerdings nur 33% gegenüber 40% bei nicht lyophilisierten Algen. Chl. vulgaris f. tertia 211-40a hat nach Lyophilisieren den gleichen TM-Wert und die gleiche Hyperchromizität wie nicht lyophilisierte Zellen. MAK-Chromatographie von N.S. aus lyophilisierter Chl. fusca 211-8b zeigt das normale Elutionsprofil.

4. Verhalten der Zellsate gegenüber der Marmur-Methode und Phenolextraktion

Es ist eine allgemein bekannte Tatsache, daß die Gewinnung von DNS aus verschiedenen Organismen nicht mit einer einzigen Methode durchgeführt werden kann. Je nach Art und Menge der übrigen Zellbestandteile sind mehr oder weniger große Modifizierungen notwendig. Vor allem stören lösliche Polykohlenhydrate, Polyphosphate und Proteine. Während lösliche Polykohlenhydrate und Polyphosphate bei Chlorella offensichtlich keine Rolle spielen, erwies sich die Extraktion des Proteins bei einer Reihe von Chlorella-Arten als nicht problemlos. Die Na-Dodecylsulfat/Perchlorat/Chloroformbehandlung nach Marmur (1961) führt bei Chl. fusca, Chl. zofingiensis und Chl. saccharophila zu einem durch Cytochrome deutlich gefärbten Überstand (Nachweis durch Absorptionsspektren). Mehrmaliges Ausschütteln mit Chloroform und Umfällen mit Äthanol oder einmaliges Ausschütteln mit Phenol/Puffer führt zu einem weitgehend proteinfreien Nukleinsäureprodukt. Die übrigen Arten von Chlorella zeigen ein anderes, wenn auch abgestuftes Verhalten: der Überstand der Marmur-Behandlung ist grünlichgelb gefärbt, wahrscheinlich durch Chlorophyll-Proteinkomplexe. Ausschütteln mit Chloroform und Äthanol-fällungen bewirken ebenso wenig wie mehrmaliges Ausschütteln mit Phenol eine quantitative Extraktion des Proteins. Die Bestimmung des Proteingehalts der

N.S. erfolgte photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260, 280 und 230 nm. Je kleiner die Extinktionswerte bei 280 und 230 nm im Verhältnis zur Extinktion bei 260 nm sind, desto weniger Protein ist vorhanden. Besonders empfindlich ist der Nachweis von Verunreinigungen der DNS bei 230 nm. Nach Marmur (1961) muß das Verhältnis der Extinktionswerte 260:230:280 für native, proteinfreie DNS im typischen Fall wie 1,000:0,450:0,515 sein.

5. Hydrolyse der RNS mit RNasen

Pankreas-RNase spaltet RNS am 3'-OH von Pyrimidinnukleotiden, RNase T₁ aus Takadiastase ist spezifisch für die Bindung am 3'-Guanyrest. Die Freisetzung von Nukleotiden führt zu einem Extinktionsanstieg bei 260 nm. Zur Ermittlung einer minimalen aber ausreichenden Hydrolysezeit bei 37°C wurde der Extinktionsanstieg bei 260 nm in einem Inkubat über 2 h lang verfolgt. Bei 2mg/ml Pankreas-RNase und 50ul/ml RNase T₁ sind 45 min ausreichend. Bei 4°C muß 24 h inkubiert werden. Die Ribonukleotide lassen sich durch Äthanol-fällung und Dialyse der Präzipitate entfernen. Die Pankreas-RNase wurde durch 10 min Erhitzen in SSC bei 80°C DNase frei gemacht. Die RNS-freie DNS wurde auf MAK chromatographiert (Abb.1).

6. Fällung von DNS mit CTA

Für die saure Hydrolyse von DNS müssen mg-Mengen an Material eingesetzt werden. Eine Reinigung durch Zentrifugation im CsCl-Dichtegradienten liefert etwa 100 ug/Ansatz. Aus Gründen der Kosten- und Zeitersparnis erschien uns eine Reinigung durch Fällung mit CTA zweckmäßig. Das bei der Proteinextraktion mit Phenol verbleibende Protein konnte mit CTA weitestgehend entfernt werden. Die als CTA-Salz gefällte DNS ging nach Waschen mit Acetat/Äthanol mit 0,1 SSC gut in Lösung, während sich das mitgefällte Protein als Präzipitat abzentrifugieren läßt. Anschließende Dialyse in Visking-Schläuchen liefert ein spektralreines Produkt. Der Arbeitsgang der CTA-Reinigung erscheint vor allem bei Chl. vulgaris, Chl. vulgaris f. tertia, Chl. luteo-viridis und Chl. protothecoides angebracht zu sein, da sich durch zweimalige Behandlung mit Phenol das Protein nicht quantitativ entfernen läßt und weitere Behandlungen mit Phenol zu einem Verlust an DNS führen. Satelliten-DNS wird nicht abgetrennt.

7. Präparation der DNS im CsCl-Dichtegradienten

Die Präparation der DNS im CsCl-Dichtegradienten diente dazu Restprotein und Satelliten-DNS abzutrennen. Weiterhin zeigte sich, daß für die Analyse im CsCl-Dichtegradienten eine vorherige Präparation über CsCl zweckmäßig ist.

Die Dichteverteilung wurde über den Brechungsindex nach der Formel

$$D^{25^{\circ}} = 10,8601 \times n_D^{25^{\circ}} - 13,4974$$

bestimmt (siehe Flamm et al., 1969), und an Hand einer Eichkurve die Dichte bei 20°C ermittelt. Der Brechungsindex wurde refraktometrisch (Abbe-Refraktometer; Zeiss, Jena) in einem durch einen Ultrathermostaten temperierten Prisma gemessen.

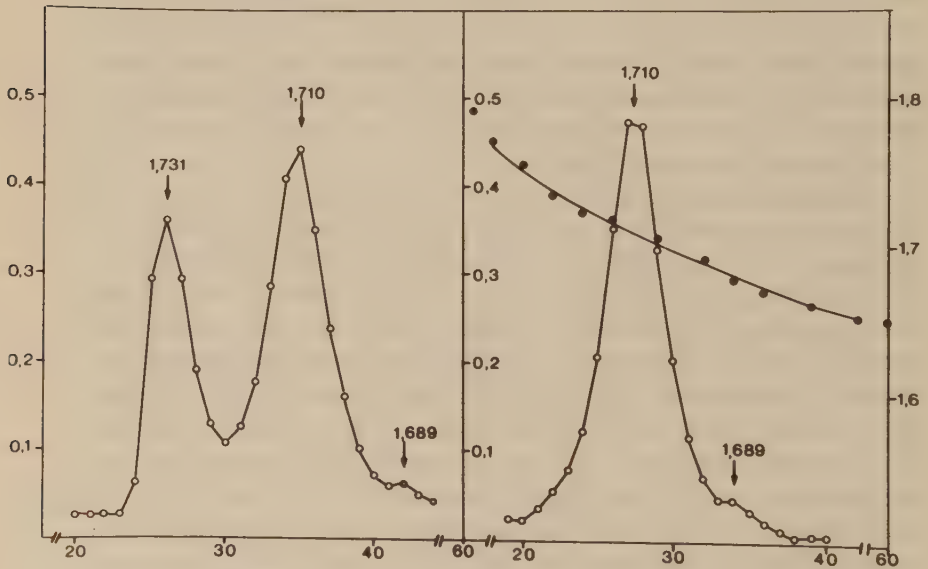


Abb.3 Präparation von DNS im CsCl-Dichtegradienten, 4 Tropfen pro Fraktion + 0,8 ml Puffer, 1 cm Lichtweg, Ordinate rechts: Dichte bei 20°C, Abszisse: Fraktionen links Boden rechts Meniskus, Chl. 211-8b (Dichte 1,710), Mikr. lysos. (Dichte 1,731), Satellit (1,689)

Abb.3 zeigt die Dichteverteilung des CsCl und die Lage einer DNS-Bande von Chl. fusca 211-8b im Gradienten. In Abb.3 wird fernerhin die Trennung von DNS aus Mikrococcus lysodeikticus und Chl. fusca 211-8b demonstriert. Der Dichteunterschied beträgt $0,021 \text{ g/cm}^3$ (Literaturdaten). Der Dichteunterschied der bisher bekannten Chloroplasten-DNS zur Kern-DNS bei Chlorella (siehe tabellarische Aufstellung bei Wanka et al., 1970) beträgt $0,021 \text{ g/cm}^3$ oder mehr. Wir nehmen daher an, daß eine Abtrennung der Satelliten-DNS erfolgt ist und ordnen die leichtere, kleine Bande einer Chloroplasten-DNS zu (Abb.3). Direkte Beweise, etwa Bestimmungen der Schwebedichte und des TM-Wertes, haben wir nicht führen können.

8. Inkubation von DNS mit Pronase

Zur Überprüfung der Reinheit der DNS wurde im Anschluß an die Zentrifugation im CsCl-Dichtegradienten, nach Dialyse des CsCl, Pronase zugesetzt (Hotta u. Bassel, 1965). Einmalige Inkubation von 4 h bei 37°C , Fällern mit Äthanol und Phenolextraktion ergaben keine Änderung der TM-Werte. Geprüft wurden die Stämme Chl. fusca 211-8b, Chl. vulgaris f. tertia 211-40a und Prag A14.

9. Gelelektrophorese von DNS

Die elektrophoretische Auftrennung von DNS-Gemischen an Polyacrylamidgelen und Mischgelen ist ein in den letzten Jahren mit großem Erfolg entwickeltes Verfahren (Loening, 1967; Peacock et al. 1968; Bishop et al., 1967; Spiess u. Richter, 1970). Die Methode führt im Vergleich zur Gradientenzentrifugation mit geringeren Aufwand zu einer größeren Auflösung. Die elektrophoretische Trennung und Gewinnung von DNS findet noch keinen allgemeinen Anklang. Die Schwierigkeit liegt offensichtlich darin, ein für das hohe Molekulargewicht der DNS passendes Gel zu finden (Loening, 1967; Zeiger et al., 1971). Wir haben den Versuch unternommen, CTA-gereinigte DNS von Chl. fusca 211-8b präparativ auf Polyacrylamidmischgelen auf dem Elektrophoresegerät nach Nees u. Schmitt (Colora, Ultraphor) zu gewinnen (Abb.4). Nach ca 1 h Laufzeit lassen sich zwei Feulgen-positive Banden identifizieren (Maurer, 1971). Eine präparative Darstellung der Banden scheiterte bisher an einer genügend langen Haftung der Gele an den Gelkammerwänden und dadurch bedingter gestörter Elution.

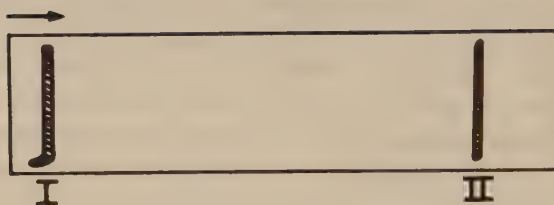


Abb.4 Agarose-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese eines DNS-Gemisches aus *Chl. fusca* 211-8b; Laufrichtung von links nach rechts; Gellänge 5,6 cm

II. Bestimmung der Basenzusammensetzung der DNS

1. Thermische Denaturierung der DNS

Wegen der guten Reproduzierbarkeit, des geringen DNS-Bedarfs (10 µg) und des relativ geringen apparativen Aufwands wurden für die Bestimmung des GC-Gehalts schwerpunktmäßig die Schmelzprofile verwendet. Beim Schmelzen von DNS, die nicht auf dem CsCl-Gradienten präpariert wurde, zeigt sich in der Region der Satelliten-DNS eine kleine Stufe, während die auf CsCl gereinigte DNS einheitlich schmilzt. Wir deuten dieses als weiteren Hinweis dafür, daß die Satelliten-DNS abgetrennt werden konnte und bei unseren Bestimmungen Kern-DNS vorliegt (Abb.5). Die von uns verwendete Apparatur zur Ermittlung der Schmelzprofile erlaubte keine kontinuierliche und gleichzeitige Registrierung von Temperatur und Extinktion. Wir bestimmten die Temperatur mit Hilfe einer Eichkurve in Schritten von 1°C und die dazugehörige Extinktion.

Trotz dieses Mangels ließ sich bei Chl. vulgaris und Chl. protothecoides eindeutig ein erster Hinweis für den unterschiedlichen Aufbau der Kern-DNS finden. Abb.6 zeigt die unterschiedlichen Schmelzprofile von Chl. vulgaris 396 und Chl. protothecoides 211-10d. Besonders auffällig ist das lange Ausschmelzen bei 211-10d im oberen Temperaturbereich.

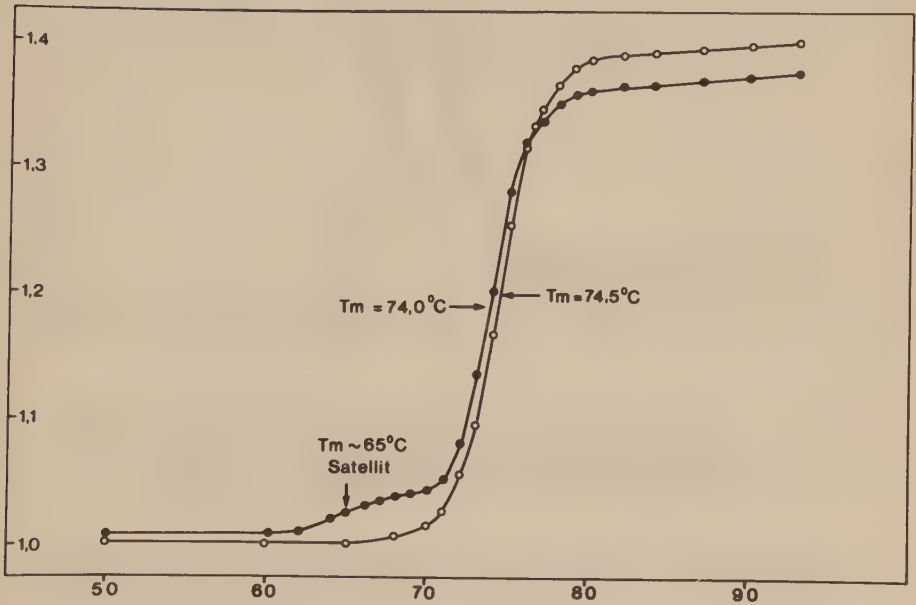


Abb.5 Thermische Denaturierung der DNS von Chl. fusca 211-8b in 0,1 SSC; Ordinate: Zunahme der Extinktion in % bezogen auf die E bei 25°C; 260 nm; Abszisse: °C; ●●● Präparation ohne und ooo Präparation mit CsCl

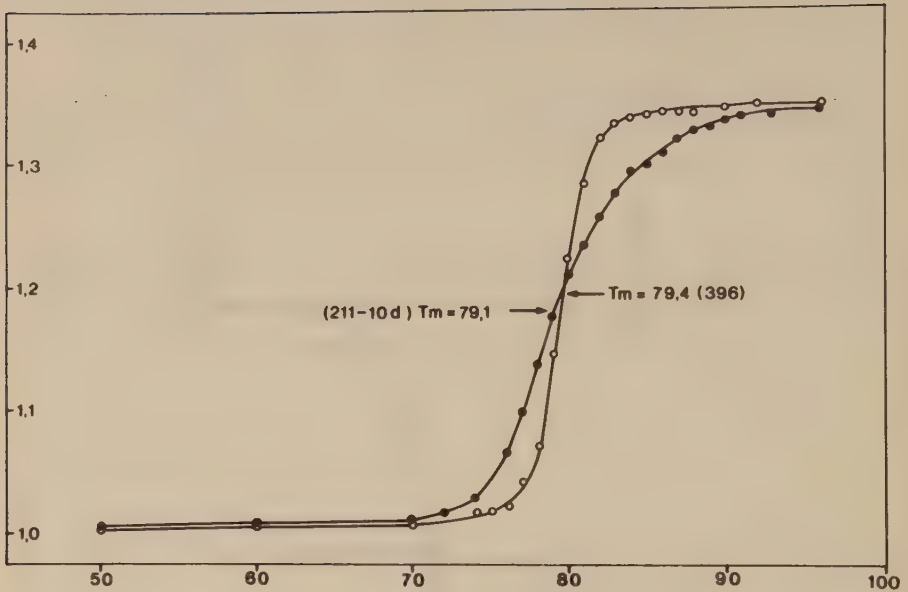


Abb.6 Thermische Denaturierung der DNS von Chl. vulgaris 396 und Chl. protothecoides 211-10d in 0,1 SSC; Ordinate und Abszisse wie Abb.5

Die differenzielle Darstellung verdeutlicht den Tatbestand (Abb.7). Die relativen Molekulargewichte wurden nach der Formel

$$M_{app} = \frac{RT \cdot \rho}{\sigma \omega r (d\rho/dr)_r}$$

aus der Dichteverteilung in der analytischen Zelle berechnet (Meselson et al., 1957). Für 396 ergab sich $2,38 \times 10^6$ und für 211-10d $2,28 \times 10^6$. Die TM-Werte differieren ebenfalls nur geringfügig: 79,4 bzw. 79,1°C. Der Extinktionsanstieg zwischen 17 und 83% erstreckt sich aber über 5°C bzw. 10°C.

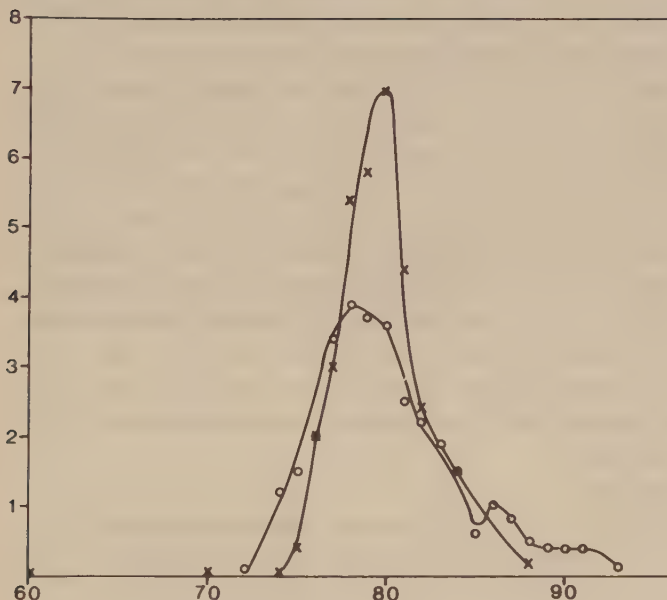


Abb.7 Differenzielle Darstellung der Schmelzprofile von *Chl. vulgaris* 396 (xxx) und *Chl. protothecoides* 211-10d (ooo); Ordinate: prozentuale Zunahme der E pro 1°C bezogen auf 25°C; 260 nm; Abszisse: °C

Zu erwähnen ist noch, daß nach Präparation in CsCl der TM-Wert in der Regel geringfügig zunimmt. Eine Kationenkonzentration über 0,0195 M (0,1SSC) dürfte wegen der einwandfrei durchgeführten Dialyse der Ansätze nicht die Ursache für das Verhalten sein. Wir glauben, daß durch Abtrennung der niedrig schmelzenden Satelliten der TM-Wert erhöht wird (Abb.5). Die Molekulargewichte, die aus der Dichteverteilung in CsCl abgeschätzt werden konnten, liegen über 10^6 ; eine Größenordnung, die exakte TM-Werte liefert (Lazurkin et al., 1970; Marmur u. Doty, 1962).

Die Reproduzierbarkeit der TM-Werte bezogen auf das GC-Verhältnis war in der Regel besser als $\pm 1\%$ GC. Die Anzahl der

Präparationen und Bestimmungen richtete sich nach der Übereinstimmung der GC-Werte mit der bisherigen taxonomischen Einordnung der Stämme, z.B.: die DNS der Stämme der Chl. kessleri wurde je einmal präpariert und von jeder Präparation zwei TM-Werte bestimmt. Bei der großen Homogenität der Werte scheint das Verfahren zu keinen ins Gewicht fallenden Fehlern zu führen. Stämme, die von dem allgemein gültigen Wert abwichen, wie z.B. die Stämme 211-40a und 211-40b vom Wert der Chl. vulgaris f. tertia, oder etwa der Stamm C-1.2.1 von Chl. zofingiensis, wurden im Minimum zweimal präpariert und jeweils zweimal der TM-Wert bestimmt. Bei Abweichungen über 1% GC wurden von einer weiteren Präparation zwei TM-Werte bestimmt und gemittelt. Es zeigte sich, daß verschiedene DNS-Präparationen eine größere Streuung der TM-Werte bewirken können, als eine Wiederholung der TM-Werte der gleichen Präparation.

2. Hydrolyse von DNS

Das klassische Verfahren zur Bestimmung der Basenzusammensetzung von DNS ist die saure Hydrolyse und anschließende Chromatographie der Spaltprodukte. Nach Kirk (1967b) und Broughton et al. (1972) lassen sich durch verdünnte Salzsäure spezifisch die Purinbasen Adenin und Guanin freisetzen. Bei der Verwendung von DOWEX 50W X8 zur Chromatographie erwies sich ein linearer Gradient von 1-4 N HCl als zweckmäßig. Guanin wird bei etwa 1,5, Adenin bei etwa 2,3 N HCl unter den gegebenen Bedingungen eluiert. Abb. 8 zeigt die Lage von Baseneluaten im Salzsäuregradienten. Die Basen wurden auf Grund der Absorptionsspektren von 350-210 nm identifiziert. Um den Fehler, der sich durch Hydrolyse, Chromatographie und Extinktionsmessung der Eluate ergibt, möglichst gering zu halten, wurden 0,5-2 mg DNS eingesetzt. Bei einer Menge von 0,5 mg DNS ist die Reproduzierbarkeit bei drei Ansätzen von Chl. fusca 211-8b besser als 1% GC. Wegen der großen Menge an DNS, die für einen Ansatz benötigt wird, handelt es sich bei den Werten in Tab.3 außer bei 211-8b, 211-5a und 211-40a jeweils um einen Meßwert. Bei den drei genannten Stämmen sind die GC-Werte aus jeweils drei Meßwerten ermittelt.

Zur Berechnung der Basenmenge der Eluate wurde die Extinktion der Fraktionen 1-40 bei 248 nm, der Fraktionen 40-70 bei 262 nm gemessen. Da die Größe der Fraktionen konstant bleibt, ist die Gesamtextinktion gleich der Summe der Extinktionswerte der Fraktionen. Je nach Anzahl der addierten Fraktionen muß anschließend das Mittel der Extinktion der Basislinie abgezogen werden. Division durch die mM-Extinktionskoeffizienten (Kirk, 1967b; $G = 10,77$ und $A = 12,09$) und Division dieser beiden Quotienten ergibt das Verhältnis von Guanin und Adenin in der DNS. Dieser Wert wiederum entspricht dem Quotienten aus $GC \times 100 / AT \times 100$ in %.

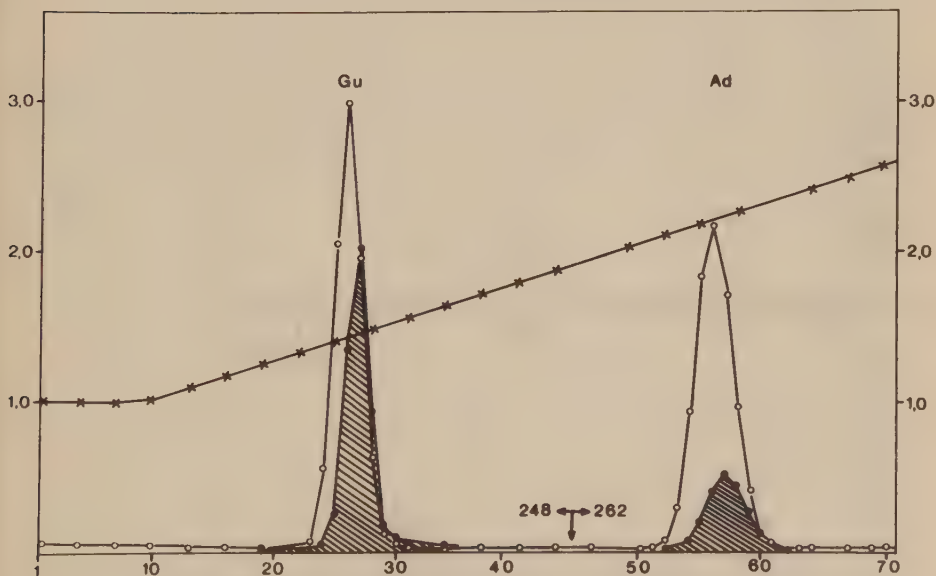


Abb.8 Ionen-Austauschchromatographie der Purinbasen Adenin und Guanin auf DOWEX 50WX 8, 200-400 mesh; $17 \text{ cm} \times 0,8 \text{ cm}^2$; linearer Gradient von 1-4 N HCl titriert mit NaOH-Bromthymolblau; Elutionsgeschwindigkeit ca. 50 ml/h; ooo = synthetische Basen im Molverhältnis Gu/Ad wie 1,1/1; ●●● = Hydrolysat von 211-40a, Gu/ad wie 3/1; Ordinate links: E bei 248 bzw. 262 nm; Ordinate rechts: N Salzsäure; Abszisse: Fraktionen

Zur Ermittlungen der optimalen Bedingungen wurden käufliche Basen chromatographiert. Es zeigte sich, daß fast die gesamte Menge der aufgetragenen Basen eluiert wird; das Verhältnis Guanin/Adenin ist nach der Elution etwa 1% größer. Bei der Berechnung der GC-Werte wurde daher 1% GC abgezogen. Eine weitere Möglichkeit zur Hydrolyse der DNS ist die enzymatische Spaltung mit DNase I und Snake venom Phosphodiesterase. Man erhält spezifisch 5'-Desoxyribonukleotide. Ein Elutionsdiagramm von Chl. minutissima 5'-Deoxyribonukleotiden zeigt Abb.9. Wegen des großen Aufwandes wurde das Verfahren nur bei einigen Algenstämmen durchgeführt. Ein Vorteil gegenüber erstgenannter Methode ist die Bestimmung des GC-Gehalts aus vier Basenwerten.

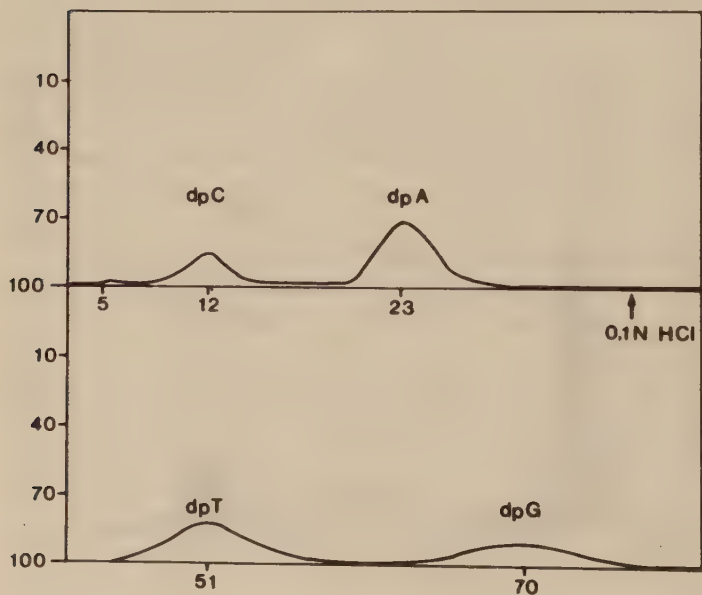


Abb.9 Chromatographie der 5'-Desoxyribonukleotide von Chl. minutissima auf DOWEX 1x2 Cl⁻, 200-400 mesh, 10 cm x 0,8 cm; 50 ml pro h, Uvicord I, Zelle 0,3 cm; Ordinate: T in °; Abszisse: Fraktionen; Gradient logarithmisch: 300 ml H₂O + 50 ml 0,05 N HCl; Zulauf von 0,1 N HCl

Tabelle 2

Bestimmung der Schwebedichte in CsCl , in g/cm^3

Art und Stammbezeichnung	Dichte	GC-Gehalt in Mol %
Chl. minutissima C-1.1.9	1,704	44,9
Chl. luteoviridis 211-5a	1,704	44,5
Chl. zofingiensis 211-14a	1,707	48,0
Chl. saccharophila 211-1f	1,709	49,8
Chl. vulgaris 211-30	1,712	52,7
Chl. fusca 343	1,712	53,2
Chl. fusca var. rubescens 232/1	1,713 (1,713)	54,0 (53,5)
Chl. kessleri C-1.1.12	1,714	55,4
Chl. saccharophila 211-1a	1,715	56,6
Chl. vulgaris 396	1,716	57,3
Chl. vulgaris f. tertia 211-8k	1,716	57,1
Chl. zofingiensis C-1.2.1	1,717	57,9
Chl. protothecoides 211-10d	1,717	58,6
Chl. vulgaris f. tertia C-1.6.7, 211-31, 211-40a	1,719	60,5
Chl. homospæra 211-8ec	1,722 (1,723)	63,0 (64,5)

RLM

B

1,704 1,731

20.12.72
Zelle ①
211-5a
T=25°C
40 000 Upm
23h

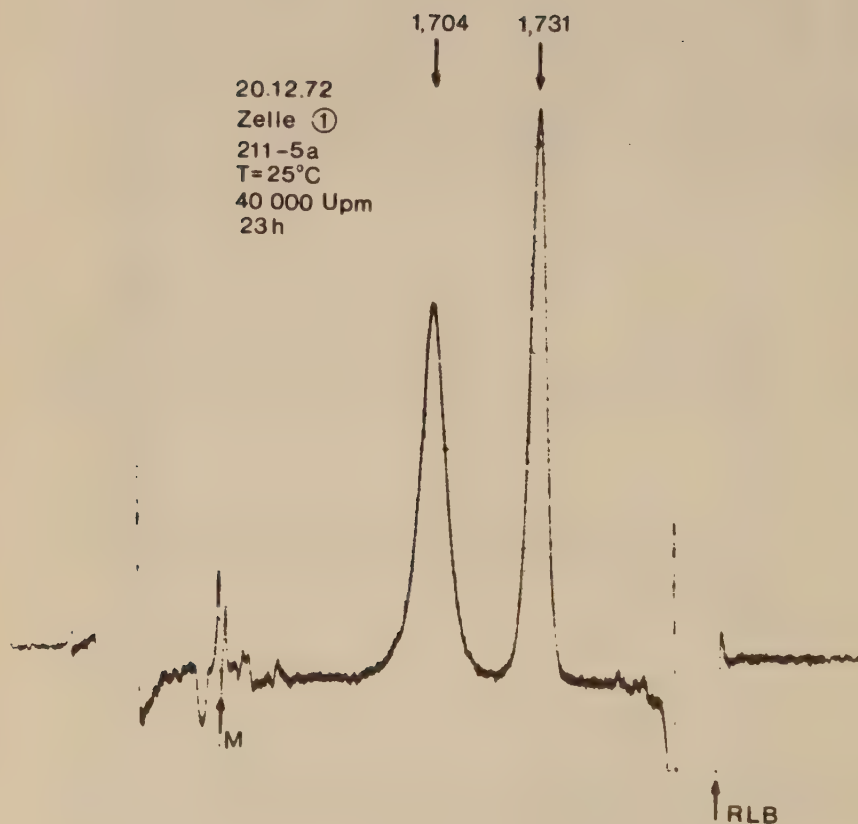


Abb.10 Gleichgewichtszentrifugation in CsCl; Analyt. Ultrazentrifuge Modell E, Fa. Beckman Instr., DNS aus 211-5a (Dichte 1,704) und Micro. lyso. (Dichte 1,731)

Zur enzymatischen Hydrolyse von DNS und zur Nukleotidchromatographie verweisen wir auf Cohn (1955,1957) und Hemleben-Vielhaben (1966).

3. Analyse der DNS im CsCl-Dichtegradienten

Bei der Bestimmung der Schwebedichten in CsCl mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge handelt es sich um je einen, bei den Stämmen 232/1 und 211-8eC um jeweils zwei Meßwerte. Da die Meßwerte bei 232/1 bzw. 211-8eC gut übereinstimmen und es sich um verschiedene DNS-Präparationen handelt, glauben wir, daß bei der Auswertung basierend auf einem Meßwert kein großer Fehler vorliegt (Tab.2). Ein Beispiel für eine Dichtebestimmung von Chl. luteoviridis zeigt Abb.10. Es ist offensichtlich keine Bandierung einer Satelliten-DNS vorhanden. Auffälligerweise differiert die GC-Bestimmung aus Schwebedichte einerseits und TM-Wert/Hydrolyse andererseits bei einer Reihe von Algenstämmen, z.B. bei 211-40a und 211-31. Ähnliche Beobachtungen finden sich bei Herrmann (1972) und Grisvard u. Guille (1973) bei anderen pflanzlichen Objekten. Entgegen der Annahme bei Schildkraut et al. (1962), daß Substitution von Cytosin durch 5-Methylcytosin die Schwebedichte erhöht, weist Kirk (1967a) nach, daß trotz einer Erhöhung des Molekulargewichts durch Basenmethylierung das spezifische Gewicht erniedrigt wird und sich dadurch die Schwebedichte in CsCl ebenfalls erniedrigt. Eine Erhöhung des GC-Gehalts berechnet aus der Schwebedichte gegenüber dem GC-Gehalt berechnet aus TM-Wert/Hydrolyse ergibt sich bei einer Reihe von Chlorellen. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf weitere seltene Basen. Bei Rae (1973) wird die Beobachtung gemacht, daß in der DNS eines Dinoflagellaten ein Teil des Thymins durch 5-Hydroximethyluracil ersetzt ist und die Schwebedichte zunimmt. Weitere Arbeiten, die zum direkten Nachweis von seltenen Basen in Chlorella-DNS führen sollen, müssen folgen.

III. Taxonomie und Basenzusammensetzung der DNS von Chlorella

Es besteht eine gute Übereinstimmung zwischen dem Merkmal GC-Verhältnis und den in Tab.3 aufgeführten Taxa von Chlorella. Bei einer Abweichung des GC-Verhältnisses handelt es sich in den meisten Fällen um Stämme, deren taxonomische Einordnung

Tabelle 3

GC-Gehalt der DNS von 88 Stämmen der Gattung Chlorella					
Art	Stamm- bezeichnung	GC-Gehalt (Mol %) berechnet aus:		Referenzen	
		Schmelzprofil (Kern-DNS)	Hydrolyse (Gesamt-DNS)	Dichte in CsCl (Kern-DNS)	
<u>Chl. fusca</u>	211-8a	50,3			
	211-8b	50,3; 48,3 ^a ; 51,0 ^b	51,7; 47,2 ^a	51,2 ^a ; 51,0 ^b	Wanka et al. (1970)(a)
Shinra	211-8c	50,3			
	211-8e	50,2			
et Krauss	211-8f	50,3			
	211-8h	50,3			
	211-11m	50,3			
	211-11n	50,3			
	211-15	50,5			
	C-1.1.10	50,3			
	343	55,3	56,8	53,2	
<u>Chl. fusca</u> var. <u>rubescens</u> (Dangeard) Kessler et al.	232/1	57,8	57,2	54,0	
<u>Chl. homophana</u> Skuja	211-8ec	69,5	66,5	63,8	

Rode u. Bayen
(1970)(b)

<u>Chl.</u> <u>luteoviridis</u>	211-2a	43,6			
	211-2b	43,8			
<u>Chodat</u>	211-3	43,8			
	211-4	43,8			
	211-5a	43,4			
	211-5b	43,9			
			46,0		44,5
<u>Chl.</u> <u>saccharophila</u>	211-1b	50,3			
(Krüger)	211-1c	50,3			
	211-1d	50,7			
<u>Nadson</u>	211-1f	49,8	51,1		49,8
	211-9a	50,5			
	211-9b	50,1			
	211-1a	57,5			
	C-1,3.1	57,3	56,0		56,6
	Tamiya		58,4		57,0 ^c ; 58,1 ^d
<u>Chl.</u> <u>zofingiensis</u>	211-14a	48,8	50,0		48,0
	211-14b	48,8			
<u>Dönz</u>	211-14c	48,6			
	C-1.2.1	64,5	64,2		57,9
<u>Chl.</u> <u>kessleri</u>	211-11g	56,0			
<u>Fott et</u>	211-11h	56,0			
<u>Nováková</u>	397	56,0			
	398	56,5			
	C-1,1.1.1	56,3	57,7		55,4
	C-1,1.1.12	56,5	57,7		
	C-1,2.2	56,0			
<u>Chl.</u> <u>minutissima</u>	C-1,1.9	43,0	46,0		44,9
<u>Fott et</u>					
<u>Nováková</u>					

Chun et al.
(1963)(c)

Iwamura u.
Kuwashima
(1969)(d)

Fortsetzung Tabelle 3

<u>Chl.</u>	<u>vulgaris</u>	211-1e	62,0	
	Bejjerinck	211-8i	62,3	
		211-8m	62,5	
		211-11b	62,3	
		211-11c	62,0	
		211-11f	62,0	
		211-11j	62,3	
		211-11i	62,5	
		211-11p	62,5	
		211-11q	62,5	
		211-11s	62,3	
		211-11t	62,3	
		211-12	61,8	
		211-19	63,0	
		211-21	62,5	
		395	62,3	
		396	63,3	
		211-11r	57,7	57,3
		211-30	57,2	
<u>Chl.</u>	<u>vulgaris</u>	211-8k	64,9	65,0
	<u>f. terttia</u>	211-11d	64,4	
	Fort et	211-11k	65,0	
	Novakova	211-32	64,4	
		211-33	65,0	
		211-34	65,0	
		C-1.1.8	65,0	66,6
		C-1.6.7	64,4	
		Sless 1	64,5	
		Sless 2	65,7	65,5
		211-31	68,8	67,0
		1-9-30	68,2	70,7
		211-18	55,0	55,3

Fortsetzung Tabelle 3

<u>Chl.</u> <u>vulgaris</u>	Prag A14	77,8	74,9	
<u>f. tentia</u>	211-40a	78,6	74,5	
Fott et	211-40c	78,6	75,0	60,5
Novakova				
<u>Chl.</u> <u>Proto-</u>	211-7a	62,0; 63,0 ^e		
<u>thecoides</u>	211-7b	62,0	62,0	
Krüger	211-7c	62,0	61,5	
	211-7d	61,5		
	211-8d	62,0		
	211-10a	62,0		
	211-10b	61,5		
	211-10c	61,5		
	211-10d	61,9		58,6
	211-10e	61,5		
	211-11a	61,8		
	211-11i	61,6		
	211-13	61,6		
	211-17	61,6		

Oshio u.
Hase (1968) (e)

auf Grund bisher untersuchter Merkmale nicht eindeutig ist. Chl. fusca 343 wird von Fott u. Nováková (1969) wegen der kleineren Zellgröße, von Shihira u. Krauss (1965) wegen unterschiedlichen Verhaltens gegen diverse Nährstoffe von Chl. fusca var. vacuolata als Chl. fusca var. fusca abgetrennt. Chl. zofingiensis C-1.2.1 ist acidophiler als die übrigen Stämme der Art und färbt sich im sauren Medium nicht orange (Kessler, 1967). Chl. saccharophila 211-1a wurde wegen der Merkmale " keine Hydrogenase, keine Sekundärkarotinoide und starke Rutheniumrot-Reaktion" zu Chl. vulgaris gestellt (Kessler u. Soeder, 1962). Wegen der unterschiedlichen Zellform, der positiven Rutheniumrot-Reaktion und der orangen Verfärbung auf Glucose-Agar wird der Stamm 211-1a von Chl. ellipsoidea getrennt (Soeder, 1963). 211-11r und 211-30 zeigen als einzige Stämme von Chl. vulgaris kein Wachstum auf Acetat (Kessler, 1972a) und vermehren sich relativ langsam unter hellgrüner Verfärbung in der normalen Nährlösung. Die Stämme 211-40a und 211-40c sind Zoochlorellen aus Schwämmen (Kessler, 1967). 211-18 und Prag A14 sind thiaminauxotroph (Kessler, 1972b; Kessler u. Zweier, 1971). Die Stämme Chl. saccharophila C-1.3.1 und Chl. vulgaris f. tertia 211-31 und 1-9-30 zeigen ein abweichendes GC-Verhältnis, ohne daß bisher eine Abweichung in anderen Merkmalen gefunden wurde. Die Stämme Chl. fusca 211-8g, 211-8h, 211-11n und C-1.1.10 scheinen zu der von Fott u. Nováková, (1969) aufgestellten Gruppe der Chl. fusca var. vacuolata zu gehören, da offensichtlich die Zuordnung des Stammes 343 zur Chl. fusca var. fusca berechtigt ist. Die Abgrenzung des Stammes 211-1f als Chl. saccharophila var. ellipsoidea von der Gruppe der Stämme Chl. saccharophila var. saccharophila durch Fott u. Nováková (1969) scheint in Bestätigung der Ergebnisse von Kessler (1967) nicht berechtigt zu sein.

Die Basenzusammensetzung weist eine recht beachtliche Breite auf (43-64% GC, einige Stämme bis 78% GC). Eine quantitative Darstellung des GC-Verhältnisses und der Anzahl der untersuchten Stämme zeigt Abb.11. Bei einem Vergleich mit höheren Pflanzen ergibt sich, daß bei der Gattung Allium 35-39% GC, unter Einbeziehung weiterer Gattungen der Liliales ein Bereich bis 45% GC bestimmt werden kann (Kirk et al., 1970). Für

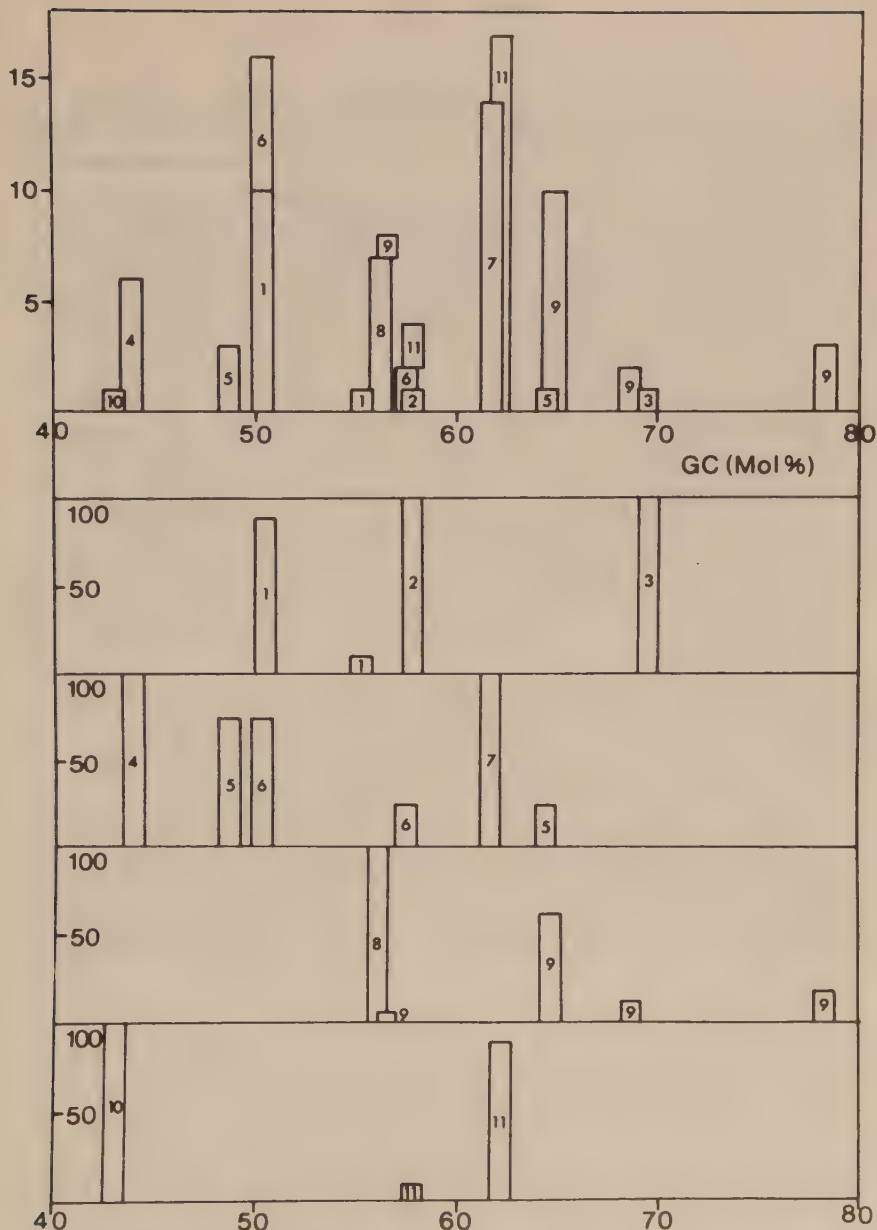


Abb.11 Die Verteilung des GC-Verhältnisses und die Arten von *Chlorella*. Ordinate oben: Zahl der Stämme; Ordinate unten: Gesamtzahl der Stämme einer Art = 100%; Abszisse: GC in Mol%; *Chl. fusca*(1), *Chl. fusca* var. *rubescens*(2), *Chl. homosphaera*(3), *Chl. luteoviridis*(4), *Chl. zofingiensis*(5), *Chl. saccharophila*(6), *Chl. protothecoides*(7), *Chl. kessleri*(8), *Chl. vulgaris* f. *tertia*(9), *Chl. minutissima*(10), *Chl. vulgaris*(11)

61 Angiospermenarten aus 35 Familien fanden Biswas u. Sarkar (1970) nur einen Bereich von 36,8 bis 42,8% GC für Dicotyledonae, einschließlich Monocotyledonae 36 bis 49% GC. Die Gruppe der Pteridophyta von Psilotales bis zu den Filicales hat eine GC-Breite von 37 bis 46% (Green, 1971). Unter dem Vorbehalt, daß die Anzahl der untersuchten höheren Pflanzen geringer ist als die Zahl der Mikroorganismen, deren DNS auf ihren GC-Gehalt geprüft wurde, so ist die Schwankungsbreite des GC-Gehalts bei Mikroorganismen wesentlich größer und der GC-Gehalt beträgt auch mehr als 50% (Bakterien 25-75%, Cyanophyta 35-71%, Algen 37-68%, Protozoa 22-68%, Pilze 27-70%: siehe Zitate bei Storck, 1972). Ein Vergleich dieser Literaturwerte mit dem GC-Gehalt der DNS von Chlorella führt zu dem Schluß, daß Chlorella wie eine Reihe von Mikroorganismen einen heterogenen Charakter und sowohl GC-als auch AT-Charakter hat. Auf die Heterogenität der morphologisch einheitlichen Chlorella verweisen schon Pinjewitsch u. Nikiforowa (1964) und Kessler (1967) im Zusammenhang mit anderen Merkmalen.

Im Gegensatz zu Chlorella erscheinen die morphologisch differenzierten Chlorococcalen Ankistrodesmus und Scenedesmus in biochemischen Merkmalen (Kessler u. Czygan, 1967) und der DNS-Zusammensetzung (Pinjewitsch u. Nikiforowa, 1964) recht einheitlich. Allerdings handelt es sich bei der Bestimmung des GC-Gehalts von Ankistrodesmus und Scenedesmus nur um fünf Arten und Stämme (Ank. falcatus 62,3% GC; Ank. braunii 61,5% GC; Scen. bijugatus 58,0% GC; Scen. obliquus 55,6% GC; Scen. quadricauda 56,0% GC).

D) Diskussion

Eine Taxonomie morphologisch einheitlicher Mikroorganismen auf Grund morphologischer Merkmale ist nur von Spezialisten zu bewältigen, wie etwa die Identifizierung und Einordnung der Chlorella-Stämme durch Fott u. Nováková (1969). Es ist daher notwendig zur Identifizierung allgemein zugängliche Merkmale zu verwenden. Da Mikroorganismen in biochemischer und stoffwechselphysiologischer Hinsicht vielseitig untersucht werden, liegt es nahe entsprechende Merkmale wie etwa den Bau von Nukleinsäuren und Proteinen oder spezifische Stoffwechselaktivitäten vergleichend zu betrachten und danach eine Einordnung der Organismen vorzunehmen. Stoffwechselaktivitäten von Chlorella wurden von Kessler u. Mitarb. in einer Reihe von Arbeiten (siehe Literaturverzeichnis) mit Erfolg zur Taxonomie verwendet.

Eine Taxonomie von Mikroorganismen ist nicht nur von theoretischer Bedeutung, um verwandtschaftliche und phylogenetische Beziehungen zu erforschen, sie hat auch fundamentale Bedeutung, wenn es darum geht die Organismen reproduzierbar zu verwenden. Neu isolierte oder mangelhaft untersuchte Stämme lassen sich in vorhandene, gute Taxa leichter einordnen oder auch als eigenes Taxon abgrenzen. Wir verweisen im Zusammenhang mit Chlorella auf die Zuordnung der "Chlorella VI" zu Chlorella vulgaris f. tertia (Kessler, 1972b) und auf die Abgrenzung der Chlorella kessleri (Kessler, 1967).

Wenn biochemisch-physiologische Merkmale notwendigerweise zur Anwendung kommen, ergeben sich die gleichen Schwierigkeiten wie bei der Verwendung morphologischer Merkmale: die Konvergenz und Rangfolge oder Wertigkeit von Eigenschaften. Zwei Wege werden zur Lösung dieser Probleme beschritten:

1. die Taxometrie. Sie benötigt pro Art oder Stamm eine möglichst große Zahl von Merkmalen. Die Taxa werden nach dem Grad der Übereinstimmung der Merkmale gebildet, so daß Konvergenzen nicht ins Gewicht fallen und das Problem der Wertigkeit von Merkmalen umgangen wird.

2. die Verwendung von konservativen Merkmalen. Durch Vergleich vieler Stämme und Arten sucht man diejenigen Eigenschaften zu finden, welche die geringsten Veränderungen erfahren, und verwendet diese als charakteristisches Merkmal des Taxons. Einen umfassenden Beitrag zur Problematik der Taxonomie der Pflanzen leistet Heywood (1970).

Es liegt nahe, bei biochemisch-physiologischen Kriterien als besonders konservatives Merkmal die Eigenschaften der DNS heranzuziehen. Aus einer Fülle von Arbeiten zur Taxonomie von Bakterien, die als Eigenschaften der DNS den Homologisierungsgrad, den GC-Gehalt und die Heterogenität verwenden, seien drei Arbeiten von DeLev u. Mitarb. (1963, 1966a,b) hervorgehoben. Bei Chlorella ist ein derartiger umfassender Versuch in vorliegender Arbeit unternommen worden; allerdings befaßt sich diese Arbeit nur mit dem statischen Merkmal GC-Gehalt. Es können daher keine bestehenden Taxa umgestoßen werden, wenn im GC-Gehalt keine Homogenität besteht, wie es auf Grund von Ergebnissen aus Hybridisierungsexperimenten möglich wäre. Das Merkmal GC-Verhältnis kann nur im Zusammenhang mit den bisher aufgestellten Taxa diskutiert werden, wie es in Tab.3 zum Ausdruck kommt. Das GC-Verhältnis bei Chlorella muß vorerst im Sinne einer Taxometrie verwendet werden. Dann zeigt sich, daß die bisherige Abgrenzung der Taxa gestützt wird, insbesondere verweisen wir auf die Abgrenzung des Taxons Chlorella kessleri, die durch vorliegende Ergebnisse bestätigt wird. Nicht eindeutig ist das GC-Verhältnis bei Chlorella vulgaris f. tertia. Obwohl die Stämme bei Kessler (1972b) befriedigend und begründet zusammengefaßt werden können, divergieren sie im Merkmal GC-Verhältnis sehr stark. Es läßt sich aus dem GC-Verhältnis allein sicherlich die Arbeitshypothese aufstellen: auf Grund des allgemein hohen GC-Gehalts der Art (Ausnahme 211-18. Der Stamm wurde nicht auf Thermophilie geprüft. Kessler, 1972b) sollte eine verwandtschaftliche Beziehung bestehen. Der direkte Beweis muß durch weitere Experimente erbracht werden: Bestimmung des Homologisierungsgrads, der Anzahl der Mitosechromosomen, des DNS-Gehalts des Kerns und einzelner Chromosomen, Untersuchungen zur Basenverteilung innerhalb der DNS. Auf die Notwendigkeit der taxometrischen Anwendung des

GC-Gehalts und der taxometrischen Betrachtung auch der übrigen Chlorella-Taxa sei im Zusammenhang mit den Daten über die sog. Abweichler unter Punkt C) (Ergebnisse, S.30) verwiesen.

Nach Durchführung der erwähnten Experimente zur Quantität und Qualität der DNS in Chlorella ließe sich vielleicht folgende Tatsache erklären: die TM-Werte (Tab.3) sind für Arten wie Chlorella fusca oder Chlorella kessleri praktisch identisch. Der Gedanke liegt nahe, eine solche Art als aus identischen Stämmen bestehend aufzufassen. Eine Isolierung und in Kulturnahme der Stämme an verschiedenen Orten der Erde würde nicht unbedingt dagegen sprechen. Denn eine Differenzierung durch räumliche Trennung, wie es bei höheren Pflanzen der Fall ist, scheint bei Chlorella auf Grund der leichten Verbreitung der Zellen und in den meisten Fällen recht unspezifischen Standorte nicht zwangsläufig zu sein. Der Auffassung von identischen Stämmen stehen allerdings die Ergebnisse von Kessler (1972a), Kessler u. Czygan (1970), Soeder (1963), Fott u. Nováková (1969) und Shihira u. Krauss (1965) gegenüber, die für eine Reihe von Merkmalen von Stämmen Abweichungen innerhalb einer Art gefunden haben. Zum Beispiel zeigt sich in Kulturversuchen mit Chlorella mit organischen Stickstoffverbindungen (Kessler u. Czygan, 1970) bei Chlorella fusca, daß der Stamm 211-8b eindeutig durch Wachstum mit Nikotinsäure abgegrenzt werden kann. Die Stämme von Chlorella fusca zeigen im Dunkeln unterschiedliches Wachstum mit diversen Kohlenhydraten (Kessler, 1972a). Eine Individualität scheint somit gerechtfertigt.

Über die Ursachen der Heterogenität der Gattung Chlorella machen sich Wanka et al. (1970) Gedanken auf Grund der damals bekannten Daten. Sie verweisen auf einen Zusammenhang von fehlender Sexualität einerseits und großer GC-Breite andererseits. Das Fehlen von Genaustausch hat möglicherweise zu dieser starken Divergenz der verschiedenen Gruppen geführt. Dem steht aber entgegen, daß Ankistrodesmus und Scenedesmus, bei denen ebenfalls keine Sexualität nachgewiesen werden konnte, in ihrer DNS-Zusammensetzung homogen sein sollen. Da es sich hier bisher nur um 5 untersuchte Arten handelt, müssen weitere Experimente folgen.

E) Zusammenfassung

Aus 88 Stämmen der Gattung Chlorella wurde die Kern-DNS isoliert.

Die Basenzusammensetzung wurde aus Schmelzprofil, Schwebedichte und Hydrolyse bestimmt.

Das Merkmal GC-Verhältnis steht in guter Korrelation zu der in den letzten Jahren entwickelten Taxonomie von Chlorella.

Die Gattung Chlorella ist in ihrer DNS-Zusammensetzung sowohl vom GC- als auch vom AT-Typ.

Die Basenzusammensetzung variiert ebenso stark wie bei anderen Mikroorganismen.

Neben den vier Basen G,C,A und T scheint bei Chlorella die DNS sog. seltene Basen zu enthalten.

F) Literatur

- Aoki, S., Hase, E.: Ribonucleic acids appearing during the process of chloroplast regeneration in the glucose-bleached cells of Chlorella protothecoides. Plant Cell Physiol. 8, 181-195 (1967).
- Bayen, M., Rode, A.: Etude des acides desoxyribonucleiques de Chlorella pyrenoidosa. Mise en evidence et proprietes des ADN satellites. C. R. Acad. Sci. (Paris) 271, 2046-2049 (1970).
- Bishop, D. H. L., Claybrook, J. R., Spiegelmann, S.: Electrophoretic separation of viral nucleic acids on polyacrylamid-gels. J. mol. Biol. 26, 373-387 (1967).
- Biswas, S. B., Sarkar, A. K.: Deoxyribonucleic acid base composition of some angiosperms and it taxonomic significance. Phytochem. 9, 2425-2430 (1970).
- Broughton, W. J., Dilworth, M. J., Passmore, I. K.: Base ratio determination using unpurified DNA. Analyt. Biochem. 46, 164-172 (1972).
- Chun, E. H. L., Vaughan, M. H., Rich, A.: The isolation and characterization of DNA associated with chloroplast preparations. J. mol. Biol. 7, 130-141 (1963).
- Cohn, W. E.: The separation of nucleic acid derivates by chromatography on Ion-Exchange columns. In: The Nucleic Acids, pp. 212-241. E. Chargaff and J. N. Davidson, eds. Vol. I. New York:Academic Press 1955.
- Cohn, W. E.: Methods of isolation and characterization of mono- and polynucleotides by ion-exchange-chromatography. In: Methods in Enzymology, pp. 724-743. S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds. Vol. III. New York: Academic Press 1957.
- Colter, J. S., Brown, R. A., Ellem, K. O.: Observation on the use of phenol for the isolation of deoxyribonucleic acid. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 55, 31-39 (1962).
- DaSilva, E. J., Gyllenberg, H. G.: A taxonomic treatement of the genus Chlorella by the technique of continuous classification. Arch. Mikrobiol. 87, 99-117 (1972).
- De Ley, J., Van Muvlem, J.: Some applications of deoxvribonucleic acid base composition in bacterial taxonomy. Antonie van Leeuwenhoek 29, 344-358 (1963).

- De Ley, J., Park, I. W.: Molecular biological taxonomy of some free-living nitrogen-fixing bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 32, 6-16 (1966a).
- De Ley, J., Park, I. W., Tijtgat, R., Van Ermengem, J.: DNA homology and taxonomy of Pseudomonas and Xanthomonas. *J. gen. Microbiol.* 42, 43-56 (1966b).
- Flamm, W. G., Birnstiel, M. L., Walker, P. M. B.: Preparation and fractionation, and isolation of single strands, of DNA by isopycnic ultracentrifugation in fixed angle rotors. In: *Subcellular Components. Preparation and Fractionation*, pp. 125-155. G. D. Birnie and S. M. Fox, eds. London: Butterworths 1969.
- Fott, B., Nováková, M.: A monograph of the genus Chlorella. The fresh water species. In: *Studies in Phycology*, pp. 10-74. B. Fott, ed. Prag: Verlag Akad. Wissensch. 1969.
- Galling, G., Hemleben-Vielhaben, V.: Zur Lokalisation schnell markierter RNS in Chlorella und Phaseolus. *Arch. Mikrobiol.* 56, 205-218 (1967).
- Green, B. R.: Isolation and base composition of DNA's of primitive land plants. I. Ferns and fern-allies. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 254, 402-406 (1971).
- Grisvard, J., Guille, E.: A new DNA extraction method for plant cells. *Prep. Biochem.* 3, 83-94 (1973).
- Hemleben-Vielhaben, V.: Characterization of rapidly labelled nucleic acids in tissues of plant seedlings. *Z. Naturforsch.* 21b, 983-992 (1966).
- Herrmann, R. G.: Do chromoplast contain DNA? II. The isolation and characterization of DNA from chromoplasts, chloroplasts, mitochondria, and nuclei of Narcissus. *Protoplasma* 74, 7-17 (1972).
- Heywood, V. H.: *Plant Taxonomy. Ser. Studies in Biology, Vol. 5.* Edward Arnold (publishers) Ltd., 1970.
- Hotta, J., Bassel, A.: Molecular size and circularity of DNA in cells of mammals and higher plants. *Proc. nat. Acad. Sci. (U.S.A.)* 53, 356-362 (1965).
- Iwamura, T., Kuwashima, S.: Two DNA species in chloroplasts of Chlorella. *Biochim. biophys Acta (Amst.)* 174, 330-339 (1969).

- Kessler, E.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung Chlorella. III. Merkmale von 8 autotrophen Arten. Arch. Mikrobiol. 55, 346-357 (1967).
- Kessler, E.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung Chlorella. VI. Verwertung organischer Kohlenstoffverbindungen. Arch. Mikrobiol. 85, 153-158 (1972a).
- Kessler, E.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung Chlorella. VIII. Die Thermophilie von Chlorella vulgaris f. tertia Fott et Nováková. Arch. Mikrobiol. 87, 243-248 (1972b).
- Kessler, E., Czygan, F. C.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattungen Ankistrodesmus und Scenedesmus. I. Hydrogenase, Sekundär-Carotinoide und Gelatine - Verflüssigung. Arch. Mikrobiol. 55, 320-326 (1967).
- Kessler, E., Czygan, F. C.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung Chlorella. IV. Verwertung organischer Stickstoffverbindungen. Arch. Mikrobiol. 70, 211-216 (1970).
- Kessler, E., Czygan, F. C., Fott, B., Nováková, M.: Über Halochlorella rubescens Dangeard. Arch. Protistenk. 110, 462-467 (1968).
- Kessler, E., Soeder, C. J.: Biochemical contributions to the taxonomy of the genus Chlorella. Nature 194, 1096-1097 (1962).
- Kessler, E., Zweier, I.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung Chlorella. V. Die auxotrophen und mesotrophen Arten. Arch. Mikrobiol. 79, 44-48 (1971).
- Kirk, J. T. O.: Effect of methylation of cytosin residues on the buoyant density of DNA in caesium chloride solution. J. mol. Biol. 28, 171-172 (1967a).
- Kirk, J. T. O.: Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid by measurement of the adenine/guanine ratio. Biochem. J. 105, 673-677 (1967b).
- Kirk, J. T. O., Rees, H., Evans, G.: Base composition of nuclear DNA within the genus Allium. Heredity 25, 507-512 (1970).

- Lazurkin, YU. S., Frank-Kamenetskii, M. D., Trifonov, E. N.:
Melting of DNA: Its study and application as a research
method. *Biopolymers* 9, 1253-1306 (1970).
- Loening, U. E.: The fractionation of high-molecular weight
ribonucleic acid by polyacrylamid-gel-electrophoresis.
Biochem. J. 102, 251-257 (1967).
- Mandel, M., Marmur, J.: Use of ultraviolet absorbance temperature
profile for determining the guanine plus cytosine content
of DNA. In: *Methods in Enzymology*, pp.195-206.
L. Grossmann and K. Moldave, eds. Vol. XIIB. New York-
London: Academic Press 1968.
- Mandel, M., Schildkraut, C. L., Marmur, J.: Use of CsCl density
gradient analysis for determining the guanine plus
cytosine content of DNA. In: *Methods in Enzymology*,
pp. 184-195. L. Grossmann and K. Moldave, eds. Vol. XIIB.
New York-London: Academic Press 1968.
- Mandell, J. D., Hershey, A. D.: A fractionating column for the
analysis of nucleic acids. *Analyt. Biochem.* 1, 66-77 (1960).
- Marmur, J.: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic
acid from microorganisms. *J. mol. Biol.* 3, 208-218 (1961).
- Marmur, J., Doty, P.: Determination of the base composition
of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation
temperature. *J. mol. Biol.* 5, 109-118 (1962).
- Maurer, H. R.: Feulgen stain for DNA. In: *Disc Electrophoresis
and related Techniques of Polyacrylamid Gel-Electro-
phoresis*, p. 78. Berlin-New York: Walter de Gruyter 1971.
- Meselson, M., Stahl, F. W., Vinograd, J.: Equilibrium
sedimentation of macromolecules in density gradients.
Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 43, 581-583 (1957).
- Oshio, Y., Hase, E.: Studies on nucleic acids in chloroplasts
isolated from Chorella protothecoides. *Plant Cell
Physiol.* 9, 69-85 (1968).
- Peacock, A. C., Dingman, C. W.: Molecular weight estimation and
separation of ribonucleic acid by electrophoresis in
agarose-acrylamid composite gels. *Biochem.* 7,
668-674 (1968).

- Pinjewitsch, W. W., Nikiforowa, L. F.: Einige Ergebnisse über die Nukleotid-Zusammensetzung und den Gehalt an DNS und RNS bei einigen protococcalen Algen (russisch). Vestn. Leningrad. Univ., Nr. 15, Ser. Biol., H. 3, 97-104 (1964).
- Rae, P. M. M.: 5-Hydroxymethyluracil in the DNA of a Dinoflagellate. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 70, 1141-1145 (1973).
- Ralph, R. K., Bellamy, A. R.: Isolation and purification of undegraded ribonucleic acids. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 87, 9-16 (1964).
- Richter, G., Beiderbeck, R.: Characterization of rapidly labelled RNA associated with DNA in Chlorella. Arch. Mikrobiol. 67, 256-272 (1969).
- Richter, G., Senger, H.: Extraktion und chromatographische Auftrennung der Nukleinsäuren aus Photosyntheseorganismen. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 87, 502-505 (1964).
- Schildkraut, C. L., Marmur, J. Doty, P.: Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from buoyant density in CsCl. J. mol. Biol. 4, 430-443 (1962).
- Shihira, I., Krauss, R. W.: Chlorella. Physiology and taxonomy of forty-one isolates. College Park, Maryland: University of Maryland 1965.
- Soeder, C. J.: Weitere zellmorphologische und physiologische Merkmale von Chlorella-Arten. In: Studies in microalgae and photosynthetic bacteria, pp. 21-34. Tokyo: Japanese Society of Plant Physiologists 1963.
- Spiess, E., Richter, G.: Isolierung und Charakterisierung schnell markierter RNS von Euglena gracilis mit Hilfe analytischer und präparativer Elektrophorese in Polyacrylamid-Gelen. Arch. Mikrobiol. 75, 37-58 (1970).
- Storck, R.: DNA of fungi. Brookhaven Symposia in Biol. 23, 371-393 (1972).
- Wanka, F., Joosten, H. F. P., de Grip, W. J.: Composition and synthesis of DNA in synchronously growing cells of Chlorella pyrenoidosa. Arch. Mikrobiol. 75, 25-36 (1970).
- Zeiger, R. S., Salomon, R., Peacock, A. C.: Isolation of mouse satellite deoxyribonucleic acid by composite polyacrylamide-gel-electrophoresis. Biochem. 10, 4219-4223 (1971).

Danksagungen

Herr Prof.Dr.E.Kessler hat die Arbeit angeregt und gefördert. Frau Prof.Dr.H.Kersten und ihren Mitarbeitern bin ich für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Methodik der DNS-Gewinnung zu Dank verpflichtet. Herrn Prof.Dr.U.Hagen (Kernforschungszentrum Karlsruhe), der Firma Beckman Instruments (München) und der Firma Heraeus Christ (Osterode) danke ich für die Durchführung der Experimente in der Analytischen Ultrazentrifuge. Ohne die tatkräftige Hilfe von Frau Rita Hellmann wären die umfangreichen technischen Arbeiten nicht durchführbar gewesen. Die Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

LEBENS LAUF

Volker Willi H e l l m a n n

- 16.4.1942 in Wanne-Eickel als Sohn des Rektors Willi Hellmann und seiner Ehefrau Irene, geb. Willmann geboren
- 1948-1952 Besuch der Grundschule in Wanne-Eickel
- 1952 Besuch des Gymnasiums in Wanne-Eickel nach bestandener Aufnahmeprüfung
- 18.1.1962 Reifeprüfung am naturwissenschaftlichen Fachbereich der Walddörferschule in Hamburg
- SS 1962 bis
SS 1969 Studium in Erlangen
- 17.12.1969 Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Höheren Schulen in den Fächern Biologie und Chemie
- seit 1970 Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten am Botanischen Institut in Erlangen.



Buchdruckerei Ludwig Müller - 852 Erlangen, Fahrstraße 5